

◦ **REMARKS**

Claims 1-23 and 34-36 are pending.

Claims 16-18 have been withdrawn from consideration as being drawn to non-elected subject matter.

Claims 24-33 have been canceled.

Claims 1, 2, 11, 13, 15, 19-22 are amended. Support for the amendments to the claims are described below.

No new matter has been added by way of the above-amendment.

Information Disclosure Statements (IDS)

The Examiner has indicated that he could not locate copies of JP2002-345465 cited in the June 10, 2004 IDS or JP7-51065 cited in the July 26, 2004 IDS. Applicants enclose herewith copies of these publications and a stamped postcard receipt for the July 26, 2004 IDS for the Examiner's consideration.

Issues under 35 USC § 112

Claims 1-15, 19-24 and 34-36 are rejected under 35 USC § 112, second paragraph for being indefinite. Applicants respectfully traverse the rejection.

In the section numbered as "5," the Examiner objects to claim 1 for reciting "wherein" phrases. In response, Applicants have amended claim 1 by deleting the term "wherein" from the beginning of the 3rd and 4th clauses in claim 1.

In the section numbered as "6," the Examiner objects to claim 1 because the Examiner alleges that it is unclear how the pressure sensor is connected to the apparatus. In response, Applicants have amended claim 1 to recite that the pressure sensor is connected to an operations part, wherein said operations part comprises a piston member comprising a plunger extending

from said second opening part side into said accommodation part. Support for this amendment to claim 1 can be found in claim 2.

In the section numbered as "7," the Examiner objects to claim 11 for not further limiting claim 1. In response, Applicants have amended claim 11 to be in independent form.

In the sections numbered as "8"- "12," the Examiner objects to the language of the claims for reciting elements which do not have antecedent basis. In response, Applicants have amended claims 13, 15, 19, 20 and 21 to give antecedent basis to the terms which have been objected to by the Examiner.

In the section numbered as "13," the Examiner objects to the term "the container." The Examiner alleges that there is insufficient antecedent basis for this limitation in claims 1, 12 and 19. In response, Applicants have amended claims 21 and 22 by deleting the phrase "inside the container".

In the section numbered as "14," the Examiner objects to claim 24. The Examiner alleges that it is unclear whether the pressure sensor recited in claim 24 is the same pressure sensor of claim 1. In response, Applicants have deleted claim 24.

Based on the foregoing, Applicants respectfully submit that the claims particularly point out and distinctly claim the subject matter which Applicants regard as the invention. As such, the claims are sufficiently definite to satisfy the requirements of 35 USC 112, second paragraph. Withdrawal of the rejection is respectfully requested.

In view of the above amendment, applicant believes the pending application is in condition for allowance.

Conclusion

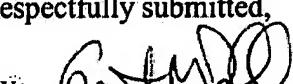
In view of the above remarks, it is believed that claims are allowable.

Should there be any outstanding matters that need to be resolved in the present application, the Examiner is respectfully requested to contact Garth M. Dahlen, Ph.D., Reg. No. 43,575 at the telephone number of the undersigned below, to conduct an interview in an effort to expedite prosecution in connection with the present application.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fees required under 37.C.F.R. §§1.16 or 1.14; particularly, extension of time fees.

Dated: September 11, 2007

Respectfully submitted,

By  #43575
Marc S. Weiner
Registration No.: 32,181
BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP
8110 Gatehouse Road
Suite 100 East
P.O. Box 747
Falls Church, Virginia 22040-0747
(703) 205-8000
Attorney for Applicant

Attachments: A) JP2002-345465
B) JP7-51065
C) stamped postcard receipt for the July 26, 2004 IDS

Papers Filed herewith on: 7-24-04

DOCKET NO: 649-994PLUS1 MFW

APPLICANT(S): Toshihiko Morita et al

APPLN. NO: 10/808411 FILED: 3-25-04

PAT. NO.: 7

New Application with Transmittal Letter

Utility Design CIP PCT Provisional

Filing Under 37 CFR 1.13(b) CONT DIV

Specification Consisting of: _____ pages

Combined Declaration & Power of Attorney

Assignment/Cover Letter

Letter to Official Draftsman

Drawings _____ Sheets Formal Informal Rect-Link

Completion of Filing Requirements, PCT/DO/EO905
or Formalities Letter and Executed Declaration

Priority Document(s)/Cover Letter, No. Doc. _____

Amendment: _____

Transm'l Ltr Large Entity Small Entity

Response

Information Disc Stmt, PTO-1449(s) 3 doc(s)

PTO/ISA/210

Notice of Appeal Appeal Brief

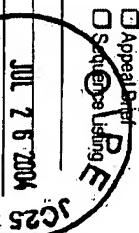
Issue Fee Transmittal Sequence Listing

FEES

Letter: _____

Other: _____

DOCKET NO: 649-994PLUS1



Receipt is hereby acknowledged of the above identified papers.

COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

Due Date: 11/24/04

Handcarry: _____

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2002345465
PUBLICATION DATE : 03-12-02

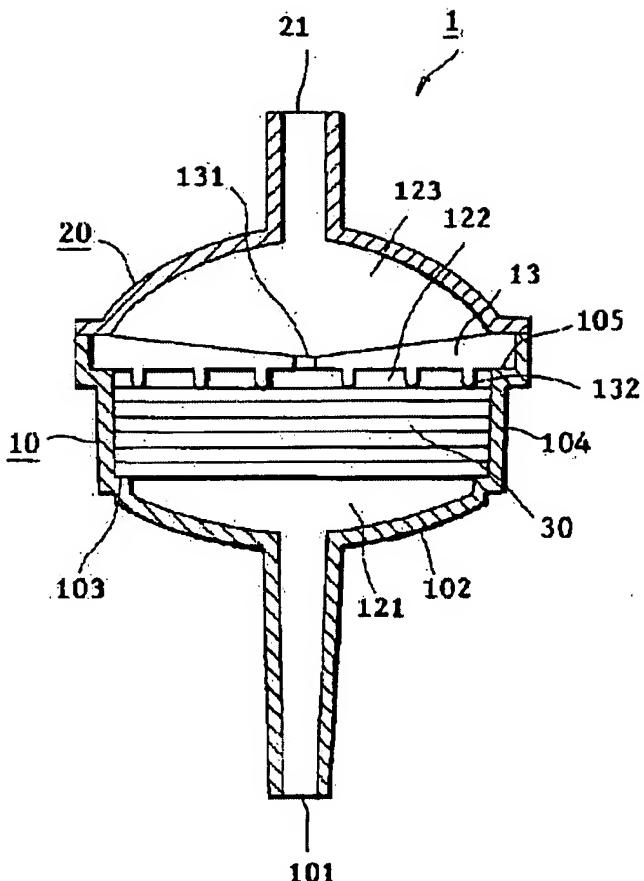
APPLICATION DATE : 24-05-01
APPLICATION NUMBER : 2001156042

APPLICANT : FUJI PHOTO FILM CO LTD;

INVENTOR : MAKINO YOSHIHIKO;

INT.CL. : C12N 15/09 C12M 1/00.

TITLE : UNIT FOR PURIFYING NUCLEIC ACID
AND METHOD FOR PURIFYING THE
NUCLEIC ACID



ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a unit for purifying a nucleic acid, capable of separating the nucleic acid from a sample solution containing the nucleic acid by only using procedures of depressurizing and pressurizing the solution, and to provide a method for purifying the nucleic acid by using the unit.

SOLUTION: The unit for purifying the nucleic acid comprises (a) a solid phase which is capable of adsorbing and desorbing the nucleic acid, (b) a container which receives the solid phase capable of adsorbing and desorbing the nucleic acid and has at least two openings, and (c) a pressure-difference generator which is connected to one of the openings of the container. The method for purifying the nucleic acid comprises using this unit.

COPYRIGHT: (C)2003,JPO

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-345465

(P2002-345465A)

(43)公開日 平成14年12月3日 (2002.12.3)

(51)Int.Cl'

C 12 N 15/09

C 12 M 1/00

識別記号

F I

データード(参考)

C 12 M 1/00

A 4 B 0 2 4

C 12 N 15/09

A 4 B 0 2 9

審査請求 未請求 請求項の数? OL (全 6 頁)

(21)出願番号

特願2001-156042(P2001-156042)

(22)出願日

平成13年5月24日 (2001.5.24)

(71)出願人 000005201

富士写真フィルム株式会社

神奈川県南足柄市中沼210番地

(72)発明者 森 寿弘

埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写
真フィルム株式会社内

(72)発明者 牧野 快彦

埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写
真フィルム株式会社内

(74)代理人 100085109

弁理士 田中 政浩

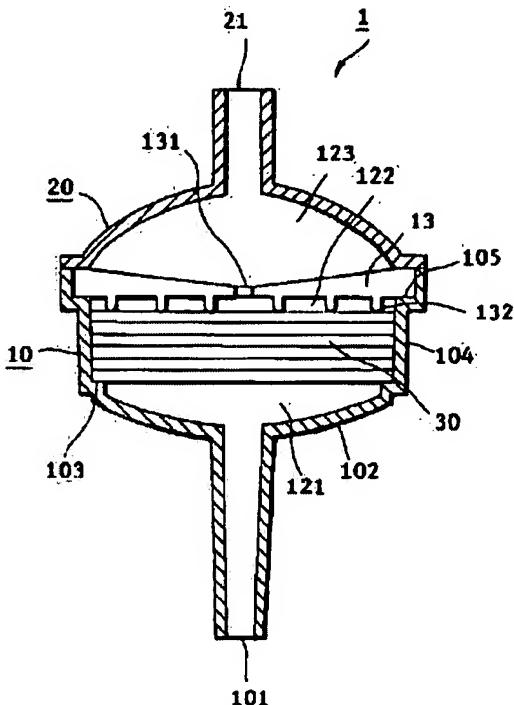
Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01 CA11 HA20
4B029 AA23

(54)【発明の名称】 核酸精製ユニット及び核酸精製方法

(57)【要約】

【課題】 減圧及び加圧操作だけで核酸を含む試料溶液から核酸を分離できる核酸精製ユニット及びそのユニットを用いた核酸の精製方法を提供することにある。

【解決手段】 上記課題は、(a)核酸の吸着及び脱着が可能な固相と、(b)この核酸の吸着及び脱着が可能な固相を収容する、少なくとも2個の開口を有する容器と、及び(c)前記容器の一の開口に結合された圧力差発生装置とを含む核酸精製ユニット、及びその精製ユニットを用いた核酸精製方法によって達成される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 核酸の吸着及び脱着が可能な固相、
 (b) 前記核酸の吸着及び脱着が可能な固相を収容する、少なくとも2個の開口を有する容器、及び
 (c) 前記容器の一の開口に結合された、圧力差発生装置、を含む核酸精製ユニット。

【請求項2】 前記核酸の吸着及び脱着が可能な固相がガラス纖維濾紙である請求項1に記載の核酸精製ユニット。

【請求項3】 前記圧力差発生装置が、前記容器の一の開口に着脱可能に結合されている、請求項1又は請求項2に記載の核酸精製ユニット。

【請求項4】 前記圧力差発生装置が注射器である請求項1に記載の核酸精製ユニット。

【請求項5】 前記圧力差発生装置がピベッタである請求項1に記載の核酸精製ユニット。

【請求項6】 前記圧力差発生装置がベリスタポンプである請求項1に記載の核酸精製ユニット。

【請求項7】 請求項1に記載の核酸精製ユニットを用いる以下の工程を含む核酸精製方法。
 (a) 前記核酸精製ユニットの一の開口を核酸を含む試料溶液中に挿入する工程、
 (b) 前記核酸精製ユニットの他の開口に結合された前記圧力差発生装置を用いて前記容器内を減圧状態にして前記核酸を含む試料溶液を吸引し、前記核酸の吸着及び脱着が可能な固相に接触させる工程、
 (c) 前記核酸精製ユニットの他の開口に結合された前記圧力差発生装置を用いて前記容器内を加圧状態にし、前記吸引された核酸を含む試料溶液を前記容器外に排出する工程、
 (d) 前記核酸精製ユニットの一の開口を核酸洗浄バッファ溶液中に挿入する工程、
 (e) 前記核酸精製ユニットの他の開口に結合された前記圧力差発生装置を用いて前記容器内を減圧状態にして前記核酸洗浄バッファ溶液を吸引し、前記核酸の吸着及び脱着が可能な固相に接触させる工程、
 (f) 前記核酸精製ユニットの他の開口に結合された前記圧力差発生装置を用いて前記容器内を加圧状態にし、前記吸引された核酸洗浄バッファ溶液を前記容器外に排出する工程、
 (g) 前記核酸精製ユニットの一の開口を、前記核酸の吸着及び脱着が可能な固相に吸着された核酸を脱着せしめる液中に挿入する工程、
 (h) 前記核酸精製ユニットの他の開口に結合された前記圧力差発生装置を用いて前記容器内を減圧状態にして、前記核酸の吸着及び脱着が可能な固相に吸着された核酸を脱着せしめる液を吸引し、前記核酸の吸着及び脱着が可能な固相に接触させる工程、及び
 (i) 前記核酸精製ユニットの他の開口に結合された前

記圧力差発生装置を用いて前記容器内を加圧状態にし、前記吸引された核酸の吸着及び脱着が可能な固相に吸着された核酸を脱着せしめる液を容器外に排出する工程。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、分子生物学の分野に関する。特に、本発明は核酸を精製するユニット及びそれを用いた核酸を精製する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】核酸は、様々な分野で、種々の形態で使用されている。例えば、組換え核酸技術の領域においては、核酸をプローブ、ゲノム核酸、およびプラスミド核酸の形状で用いることを要求する。

【0003】診断分野においても、核酸は種々の方法で用いられている。例えば、核酸プローブは、ヒトの病原体の検出および診断に日常的に用いられている。同様に核酸は遺伝障害の検出に用いられている。核酸はまた食品汚染物質の検出にも用いられている。さらに、核酸は遺伝地図の作製からクローニングおよび組換え発現における種々の理由により、興味ある核酸の位置確認、同定および単離において日常的に用いられている。

【0004】多くの場合、核酸は極めて少量でしか入手できず、そして単離および精製操作が煩雑で時間を要する。このしばしば時間を消費する煩雑な操作は核酸の損失に結びつきやすい。血清、尿およびバクテリアのカルチャーから得られた試料の核酸の精製においては、コンタミネーションおよび疑陽性の結果が生じるという危険性も加わる。

【0005】従来一般的に行われている精製方法では、遠心分離操作が含まれている。例えば特公平7-5106.5、特表平2000-505295等に開示されている方法では、シリカ粒子に代表される、核酸が結合可能な固相に核酸を含む試料液を接触させて当該固相に核酸を結合させ、次いで遠心分離により核酸が結合した固相を分離している。

【0006】しかし、遠心分離操作には大きな問題点がある。即ち、遠心分離機にかける必要があるため、精製操作を連続的な工程に組み込むことができない。また、通常試料を移し替えるので、試料が汚染される機会が増える。

【0007】また、クロマトグラフィ法を利用した精製方法も公開されているが(特開2000-9317)
 1)、この方法では、独立した液体吸引器具を使用して、液体の吸入及びカラムへの吐出操作が必要で、操作が煩雑となる。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、遠心分離操作を必要とせず、また操作が煩雑なクロマトグラフィ法と異なり、減圧及び加圧操作だけで核酸を含む試

料溶液から核酸を分離できる核酸精製ユニット及びそのユニットを用いた核酸の精製方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明の課題は、(a)核酸の吸着及び脱着が可能な固相、(b)この核酸の吸着及び脱着が可能な固相を収容する、少なくとも2個の開口を有する容器、及び(c)前記容器の一の開口に結合された、圧力差発生装置を含む核酸精製ユニット、及びその精製ユニットを用い、減圧及び加圧操作による核酸を含む試料溶液の吸引及び排出操作と、それに続く核酸洗浄バッファ溶液の吸引及び排出操作と、それに続く核酸の吸着及び脱着が可能な固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液の吸引及び排出操作を含む核酸精製方法により達成された。ここで、本発明において「核酸」は一本鎖、二本鎖のいずれでもよく、また、分子量の制限も無い。

【0010】

【発明の実施の形態】核酸の吸着及び脱着が可能な固相(以下、「固相」と記す)としては、シリカゲル、ガラス、アルミナ、ゼオライト、二酸化チタン、二酸化ジルコニウム、金属酸化物及び/又は混合金属酸化物等からなる多孔性又は非多孔性の無機材料が挙げられる。これらの中ではガラス、特にガラス繊維濾紙が好ましい。ガラス繊維濾紙としては、ワットマン社製のG-F/A、G-F/B、G-F/C、G-F/D、あるいはアドバンテック社の製品等が使用できる。この際、これらのガラス繊維濾紙の密度、保留粒子径、ガラス繊維の太さ等には無関係に使用可能である。

【0011】この固相を収容する容器の材料に特別な限はなく、固相が収容でき、かつ少なくとも2個の開口を設けることができればよいが、製造の容易性からプラスチックが好ましい。例えば、ポリスチレン、ポリメタアクリル酸エチル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエチル、ナイロン、ポリカーボネート等の透明あるいは不透明の樹脂を用いるのが好ましい。

【0012】以下、固相としてガラス繊維濾紙を使用した態様を例にして、本発明について詳細に説明する。

【0013】容器は、通常、ガラス繊維濾紙を収容する本体と、蓋体に分けた態様で作製され、いずれにも少なくとも1個の開口が設けられている。一方は核酸を含有する試料溶液、核酸洗浄バッファ溶液及び核酸の吸着及び脱着が可能な固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液(以下、「試料溶液等」と記す。)の入口及び出口として使用され、他方は容器内を減圧又は加圧状態にせしめうる圧力差発生装置に接続される。本体の形状に特に限定はないが、製造が容易で、試料溶液等がガラス繊維濾紙の全面に拡散し易くするには、断面を円形にすることが好ましい。断面を四角形にすることも、ガラス繊維濾紙の裁断屑を発生させないために好ましい。

【0014】上記蓋は、圧力差発生装置によって容器内部を減圧及び加圧状態にできるように本体に接合されている必要があるが、この状態が達成できれば、接合方法は任意に選択できる。例えば、接着剤の使用、ねじ込み、はめ込み、ネジ止め、超音波加熱による融着等が挙げられる。

【0015】容器の内容積は処理すべき試料溶液の量のみによって決められるが、通常、収容するガラス繊維濾紙の体積で表す。即ち、厚さが約1mmで直径が約2mm~2.0mmのガラス繊維濾紙を1枚~6枚程度収容する大きさとすることが好ましい。

【0016】ガラス繊維濾紙の端面は、試料溶液等が通過しない程度に、容器の内壁面に密着させることが好ましい。

【0017】試料溶液等の入り口に使用される開口に対向するガラス繊維濾紙の下は、容器の内壁に密着させずに空間を設け、試料溶液等がガラス繊維濾紙の全面にできるだけ均等に拡散する構造にする。

【0018】他の一の開口、即ち圧力差発生装置に結合される開口に対向するガラス繊維濾紙の上には、ほぼ中央に穴を穿った部材を設けることが好ましい。この部材は、ガラス繊維濾紙を押さえると共に、試料溶液等を効率よく排出する効果を有するものであり、液が中央の穴に集まる様に、漏斗状あるいはお椀状等の斜面を有する形状にすることが好ましい。この穴の大きさ、斜面の角度、部材の厚さは、処理する試料溶液等の量やガラス繊維濾紙を収容する容器の大きさ等を考慮して、当業者が適宜定めることができる。この部材と当該開口の間に、オーバーフローした試料溶液等を溜めて、圧力差発生装置内に吸引されることを防ぐための空間を設けることが好ましい。この空間の大きさも当業者が適宜選択することができる。なお、核酸を効率良く集めるためには、ガラス繊維濾紙の全体が浸る以上の量の核酸を含む試料溶液を吸引することが好ましい。

【0019】また、吸引している開口の真下の部分にのみ試料溶液等が集中することを防いで、試料溶液等がガラス繊維濾紙内を比較的均一に通過できるようにするために、ガラス繊維濾紙とこの部材の間にも空間を設けることが好ましい。このためには、当該部材からガラス繊維濾紙に向けて複数の突起物を設けることが好ましい。突起物の大きさや数は当業者が適宜選択することができるが、空間を保持しながらガラス繊維濾紙の開口面積をできる限り大きく保つことが好ましい。

【0020】なお、容器に3以上の開口を設けた場合には、減圧及び加圧操作に伴う液の吸引及び排出を可能にすべく、余分の開口を一時的に封鎖する必要があることはいうまでもない。

【0021】圧力差発生装置は、まずガラス繊維濾紙を収容した容器内を減圧にして核酸を含む試料溶液を吸引する。圧力差発生装置としては、注射器、ピベッタ、あ

るいはペリスタポンプのような吸引及び加圧が可能なポンプ等が挙げられる。これらの内、手動操作には注射器が、自動操作にはポンプが適している。また、ビベッタは片手操作が容易にできるという利点を有する。

【0022】次に、上記核酸精製ユニットを使用した、核酸の精製方法について説明する。本発明において使用できる核酸を含む試料溶液に制限はないが、例えば診断分野においては、検体として採取された全血、血漿、血清、尿、便、精液、唾液等の体液等から調製された溶液が対照となる。

【0023】最初にこれらの検体を核酸溶解バッファ溶液で処理する。本発明で使用する核酸溶解バッファは主剤、緩衝剤、必要に応じて界面活性剤、及びプロテアーゼK等の細胞膜を溶解する試薬を含む水溶液である。主剤としては塩化グアニジン、イソチオシアノ酸グアニジン、チオシアノ酸グアニジン、過塩素酸ナトリウム、沃化ナトリウム等が使用でき、緩衝剤としては、Tris、EDTAが、界面活性剤としてはTriton-X 100等が使用できる。これらの内では、塩化グアニジン及びTrisが好ましい。緩衝剤の好ましい濃度は10～100mM、界面活性剤の好ましい濃度は0.1～1.0%である。

【0024】このように調製された核酸を含む試料溶液中に、上記の、本発明に係る核酸精製ユニットの一の開口を挿入する。次いで他の一の開口に接続された圧力差発生装置を用いて精製ユニットの内部を減圧にして試料溶液を容器内に吸引する。この操作により、試料溶液が固相と接触して試料溶液中にある核酸が固相に吸着する。この際に、固相のほぼ全体と接触する量の試料溶液を吸引することが好ましいが、圧力差発生装置内に吸引すると装置を汚染するので、適量に調整する。

【0025】適量の試料溶液を吸引後、圧力差発生装置を用いてユニットの容器内を加圧して、吸引した液を排出する。この操作までに間隔を開ける必要はなく、吸引後直ちに排出してもよい。

【0026】次に、上記と同様の減圧-加圧操作で核酸洗浄バッファ溶液を容器内に吸引し、これから排出して容器内部を洗浄する。この溶液は容器内に残留する試料溶液を洗い流すと共に、核酸と一緒にガラス繊維滤紙に吸着した試料溶液中の不純物も洗い流す機能を有する。従って、ガラス繊維滤紙から核酸は脱着させないが不純物は脱着させる組成を有する必要がある。核酸洗浄バッファ溶液は主剤と緩衝剤、及び必要に応じて界面活性剤を含む水溶液からなり、主剤としてはメチルアルコール、エチルアルコール、ブチルアルコール、アセトン等の約10～90%（好ましくは約50～90%）の水溶液が、緩衝剤及び界面活性剤としては、既述の緩衝剤及び界面活性剤が挙げられる。これらの内では、エチルアルコール、Tris及びTriton-X 100を含む溶液が好ましい。Tris及びTriton-X 100 50

の好ましい濃度は、それぞれ10～100mM、及び0.1～1.0%である。

【0027】次に、ガラス繊維滤紙に吸着した核酸を脱着せしめうる溶液を、上記と同様の減圧-加圧操作によって容器内部に導入し、容器から排出する。この排出液には目的とする核酸が含まれているので、これを回収し、後に続く操作、例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）による核酸の増幅に提供する。

【0028】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0029】

【実施例】実施例1 核酸精製ユニット

図1は、本発明に係る核酸精製ユニットの断面図である。但し圧力差発生装置は図示していない。固相を収容する容器1は、本体10と蓋20から成り、透明なポリスチレンで形成されている。本体10はガラス繊維滤紙30としてGF/D（ワットマン社製）を6枚収容している。また、試料溶液等を吸引する開口101を有する。開口から続いている底面102は漏斗状に形成され、ガラス繊維滤紙30との間に空間121が設けられている。ガラス繊維滤紙30を支えて空間121を保つために、底面102と一体となった枠103が設けられている。

【0030】本体は、内径が20.1mm、深さが5.9mm、底面102から開口101までの長さは約70mmである。また、内蔵されているガラス繊維滤紙30の直径は20.0mm、一枚の厚さは0.91mmである。

【0031】図1において、ガラス繊維滤紙の上部には漏斗状の押さえ部材13が設けられている。押さえ部材13の中央には穴131があり、かつ下方に一群の突起132が設けられ、ガラス繊維滤紙30との間に空間122が設けられている。ガラス繊維滤紙30と本体10の壁104の間から試料溶液等が漏れにくい様に、壁104の上部の直径はガラス繊維滤紙の直径より大きく作成され、段差105の上に押さえ部材13の端が乗っている。

【0032】蓋20は本体10と超音波加熱により接合されている。蓋20のほぼ中央部には、圧力差発生装置を結合する開口21が設けられている。蓋20と押さえ部材13の間には、穴131から流出する試料溶液等を保持する空間123が設けられている。空間123の容積は約0.1mlである。

【0033】実施例2 実施例1の核酸精製ユニットを使用した核酸の精製

市販の採血管を用いて、ヒト全血を2ml採血した。この全血に、表1の組成を有する核酸溶解バッファ溶液2mlを添加し、60°Cで10分間インキュベートした。

【0034】

表1 核酸溶解バッファ溶液の組成

塩化グアニン（ライフテクノロジー社製）	3.82 g
Tris（ライフテクノロジー社製）	12.1 g
Triton-X100 (ICN社製)	10 g
プロテアーゼK	20 μl
2回蒸留水	1000 ml

【0035】インキュベート後、実施例1に記載した核酸精製ユニットの開口101を液中に挿入し、開口2-1に、テルモ社製の5 mlの注射器を接続して（図示せず）吸引した。この際、吸引速度に限定は不要なので、液が注射器内に流入しないように目視で調節した。ついで、開口2-1に接続されたままの注射器を用いて加圧し、液を排出した。後述する通り、この操作により、ガラス繊維滤紙に核酸が吸着された。

【0036】排出後直ちに、表2の組成を有する核酸洗浄バッファ溶液中に開口101を挿入し、同様の減圧-加圧操作によってユニット内部を洗浄した。

【0037】表2 核酸洗浄バッファ溶液の組成

10 mM Tris-HCl 7.0% エタノール

【0038】この洗浄は、ガラス繊維滤紙に吸着した不純物及び容器内部の核酸を含む試料溶液の残留物を洗浄*

*するための操作であり、ガラス繊維滤紙に吸着された核酸にはなんら影響を与えない。

【0039】洗浄液の排出後直ちに、2 mlの精製蒸留水を用いて同様の吸引-排出操作を行い、この排出液を回収した。この操作により、ガラス繊維滤紙に吸着した核酸が精製蒸留水中に脱着し、回収された。

【0040】実施例3 核酸の回収量の定量

実施例2で回収した液の吸光度を測定することにより、液中に含まれる核酸の量と純度を定量した。当業者に公知の方法に従い、波長260 nmにおける吸光度により核酸の量を定量し、波長260 nm及び280 nmにおける吸光度の比率から純度を決定した。なお、この比率が1.8以上であれば純度は良好であると判断される。

測定結果を表3に示す。

【0041】

表3 吸光度の測定

試料番号	核酸量	吸光度の比率 (260 nm/280 nm)
1	1.21 μg	1.865
2	1.08 μg	1.932
3 (パッフィーコート)	2.91 μg	1.899

【0042】実施例4 PCRによる增幅

実施例2で回収した液を用いて、PCRによる核酸の増*

※幅を実施した。先ず、表4に示す組成の液を調製した。

【0043】

表4 液組成

回収液	2 μl
精製水	36.5 μl
PCRバッファ10倍希釈液	5 μl
2.5 mM dNTP	4 μl
Taq FP	0.5 μl
プライマー	2 μl

(P53エクソン6を増幅するように設計)

【0044】この液を94°Cで30秒間変性した後、65°Cで30秒間アニーリングし、72°Cで1分間伸長反応を行った。この工程を30回繰り返した。こうして得られた液と、ポジティブコントロールとしてクロンテック社製のHuman DNAと、及びネガティブコントロールとして精製水を用い、1.5%アガロースゲルにて1時間、定法に従って電気泳動を実施した。結果を図2に示す。図2において、最上段はマーカーの、二段目はポジティブコントロールの、三段目はサンプル1の、そして四段目はサンプル2の電気泳動の結果である。また、何も現れていない最下段はネガティブコントロールの結果である。

【0045】実施例3及び実施例4の結果から、実施例

2で得た回収液中には実用的な量及び純度の核酸が含まれていたことが判る。

【0046】

【発明の効果】本発明の核酸精製ユニット及び核酸精製方法により、圧力差を利用した試料溶液等の吸引及び排出という簡単な操作で、血液等から実用的な量及び純度の核酸を得ることができる。本発明の方法は、特に連続工程中に容易に組み込むことができるという利点を有する。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明になる核酸精製ユニットの一例である。但し、開口2-1に結合されるべき圧力差発生装置は図示していない。

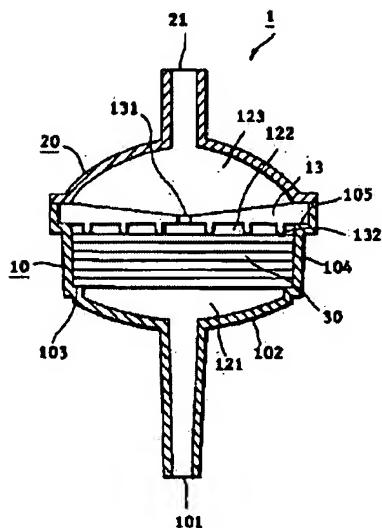
【図2】 図2は、本発明の核酸精製ユニットを使用し、本発明の核酸精製方法によって回収した核酸をPCRによって増幅した試料の、電気泳動の結果である。

【符号の説明】

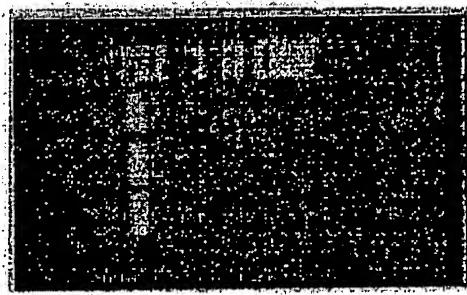
1…容器
10…本体
101…開口
102…底面
103…枠
104…壁

*10.5…段差
12.1…空間
12.2…空間
12.3…空間
13…押さえ部材
13.1…穴
13.2…突起
2.0…蓋
21…開口
*10 30…ガラス繊維滤紙

【図1】



【図2】



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 07-051065
 (43) Date of publication of application : 28.02.1995

(51) Int.Cl. C12N 15/09
 G01N 33/50
 // C07K 14/00
 C12P 21/02

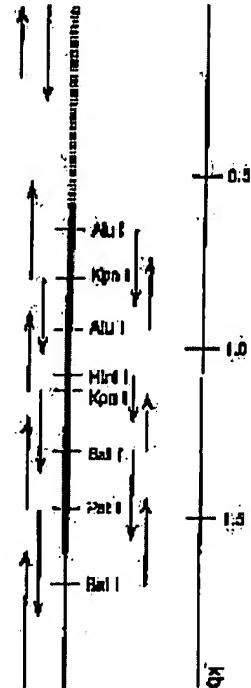
(21) Application number : 04-035085 (71) Applicant : NIPPON KOUTAI KENKYUSHO:KK
 KAGOSHIMA UNIV
 (22) Date of filing : 21.02.1992 (72) Inventor : MASUZAWA YASUSHI
 MURAMATSU TAKASHI
 MIYAUCHI TERUO

(54) GLYCOPROTEIN 39 GENE

(57) Abstract:

PURPOSE: To provide a new gene useful for the production of a human-originated mucin glycoprotein 39 useful as a tumor marker, immune abnormality marker and marker for various inflammatory diseases.

CONSTITUTION: This glycoprotein 39 gene is cDNA clone pKP39 coding glycoprotein 39 and having restriction map and a base-sequence determination method shown in the drawing. The glycoprotein 39 gene can be produced by separating whole RNA from a cell expressing glycoprotein 39 (e.g. gastric cancer cell strain KATO-III), purifying mRNA therefrom, synthesizing cDNA by conventional method, constructing a library by integrating into an expression vector and selecting a clone having glycoprotein 39 gene by using an anti-glycoprotein 39 antibody.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 11.11.1997

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3023469
[Date of registration] 21.01.2000
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-51065

(43)公開日 平成7年(1995)2月28日

(51)Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/09				
G 01 N 33/50	T 7055-2J			
// C 07 K 14/00		8318-4H		
C 12 P 21/02	C 9282-4B			
	9050-4B		C 12 N 15/00	A
			審査請求 未請求 請求項の数 3 OL (全 10 頁)	

(21)出願番号 特願平4-35085

(22)出願日 平成4年(1992)2月21日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成3年8月25日、
社団法人日本生化学会発行の「生化学V o 1. 63, N
o. 8, 1991」に発表

(71)出願人 000153258
株式会社日本抗体研究所
群馬県高崎市西横手町351番地1

(71)出願人 391012523
鹿児島大学長
鹿児島県鹿児島市郡元1丁目21番24号

(72)発明者 増沢 幸
埼玉県川口市四川口2丁目14-6

(72)発明者 村松 達
鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘3丁目26-9

(72)発明者 宮内 照雄
鹿児島県鹿児島市宇宿町689 USKビル
202

(74)代理人 弁理士 有賀 三幸 (外2名)

(54)【発明の名称】 糖タンパク質39遺伝子

(57)【要約】

【構成】 配列表で示されるアミノ酸配列を含有し、配
列表で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含
有するヒト由来の糖タンパク質39遺伝子。

【効果】 本発明糖タンパク質39遺伝子を用いれば、
糖タンパク質39のコアタンパク質を容易にかつ大量に
製造することができる。本発明の糖タンパク質39は、
ヒト癌組織、特に胃癌、大腸癌、肺癌、肝癌、食道癌、
肺癌などに発現が認められる一方、胃、結腸、肺など分
泌性正常組織に発現していることより、腫瘍マーカー、
免疫異常マーカーあるいは各種炎症性疾患マーカーとし
ての応用が期待される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 糖タンパク質3'9遺伝子。

【請求項2】 配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列と配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列とを含有する請求項1記載の遺伝子。

【請求項3】 配列番号1で示される5'末端側部分の塩基配列と配列番号2で示される3'末端側部分の塩基配列とを含有する請求項1記載の遺伝子。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は新規なムチン糖タンパク質3'9遺伝子に関し、更に詳細には腫瘍マーカー、免疫異常マーカーあるいは各種炎症性疾患マーカーとして有用なヒト由来のムチン糖タンパク質3'9のコアタンパク質をコードする塩基配列を含有する遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】 一般に癌化した細胞の細胞膜には正常な細胞とは異なる糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質が存在することが知られている。またガンを診断するに際し、癌患者において特異的に産生されるタンパク抗原や糖鎖抗原を測定する方法が行なわれている。その例としては、癌胎児抗原(CEA)、 α -フェトプロテイン、CA19-9などの測定による消化器系癌の診断等が知られている〔村松喬、日本臨床、44, p.337-344(1986)；神奈木玲児、臨床病理、35, p.1247-1264(1986)；医学のあゆみ、106巻、5号、第5土曜特集、235～250頁(1978年)〕。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、従来の各種癌抗原測定を利用するガンの診断法は適用できる癌の種類が比較的限られていたり、健常人や肝炎等の他疾患との交差反応がおこるなどの問題点があり、より広範な種類の癌に適用できる診断法又は特異性の高い診断法が望まれている。また、種々の免疫異常応答に基づく疾患や各種炎症性疾患においても適確な診断法が望まれている。そして、かかる疾患の診断に利用出来る腫瘍マーカー、免疫異常マーカーあるいは各種炎症性疾患マーカーとなり得る新たな糖タンパク質及びそのコアタンパク質をコードする遺伝子の開発が切望されている。

30

【0004】 一方、近年、各種癌組織等において発見しているムチンの糖鎖およびコアタンパク質の構造解析が進展し、癌をはじめとする各種疾患との関連性が注目されてきている〔Bhavanandan, V. P., Glycobiology, 1, 493-503(1991)〕。

【0005】

【課題を解決するための手段】 そこで本発明者らは、上記課題を解決する目的でヒト胃癌細胞表面に発現する糖タンパク質に着目して研究をしてきたところ、腫瘍、免疫異常あるいは各種炎症性疾患の診断への応用が期待さ

れる新規ムチン糖タンパク質3'9のコアタンパク質をコードする遺伝子を見出し、これが乳癌や肺癌において見出されたポリモルフィック エビセリアル ムチン(P EM)と高いホモロジーを示すが、明らかに異なる新しいムチンであることを明らかにし、本発明を完成した。

【0006】 すなわち、本発明はヒト由来の新規ムチンのコアタンパク質をコードする糖タンパク質3'9遺伝子を提供するものである。

【0007】 本発明遺伝子は、例えば配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列と配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列、これらのアミノ酸配列に相補的な塩基配列、又はそれらの両者を含有するものである。なお、配列表において、塩基配列の下段は上段の塩基配列より推定されるアミノ酸配列である。

【0008】 本発明の糖タンパク質3'9遺伝子は、例えば以下のようにして調製される。すなわち、まず糖タンパク質3'9を発現している細胞より全RNAを分離し、これよりmRNAを精製し、常法によりcDNAを合成したのちこれを発現ベクターに組込んだライブラリーを構築する。次いで抗糖タンパク質3'9抗体を用いてこのcDNAライブラリーより糖タンパク質3'9遺伝子を有するクローンを選択し、本発明の糖タンパク質3'9遺伝子を得る。次に上記本発明遺伝子の製法につき、詳細に説明する。

【0009】 [1] cDNAライブラリーの構築

全RNAの抽出に用いられる組織細胞としてはヒト胃癌組織又は既にセルラインとして確立された細胞株、例えば胃癌細胞株KATO-III [Sekiguchi M., Sakakibara K. and Fujii G. (1978). Jpn. J. Exp. Med., 48, p.61-68] が挙げられる。

【0010】 RNAの抽出は、グアニジン-イソチオシアネート混合液又は適当な界面活性剤、例えばSDS, NP-40, トリトンX-100、デオキシコール酸等を用いて、或いはホモジナイザーを用いる方法や凍結融解等の物理的方法によって、細胞を部分的又は完全に破壊、可溶化した後、染色体DNAを、ポリトロン等のミキサーもしくは注射筒を用い、ある程度せん断し、その後、蛋白質と核酸分画とを分別する操作により行なわれる。この操作には、特にフェノール・クロロホルム抽出もしくは超遠心を用いるCsCl重層法 [Chirgwin, J. M., et al., Biochemistry, 18, p.5294(1979)] 等が一般に用いられる。

【0011】 また上記各方法においては、RNaseによるRNAの分解を防ぐために、RNase インヒビター、例えばヘパリン、ポリビニル硫酸、ジエチルビロカーボネート、バナジウム複合体、ベントナイト、マカロイド等を添加していくのがよい。

【0012】 上記抽出操作に従って得られるRNAからのmRNAの分離、精製は、抽出物を例えばオリゴdT-セルロース (Collaborative Research Inc.)、ポリU-セファロース (ファルマシア社) 等の吸着カラムを用いる方法

により又はバッヂ法により実施できる。

【0013】上記により得られる精製mRNAは、通常不安定であり、安定な相補DNA(cDNA)の型に代えられ、目的遺伝子の増幅を可能とするために微生物由来のベクターに接続される。インピトロでの、上記mRNAのcDNAへの変換、即ちcDNAの合成は、一般に次のようにして行なうことができる。

【0014】即ち、まずオリゴdTをプライマーとし(このプライマーは遊離のオリゴdTもしくは既にベクタープライマーに付加されたオリゴdTのいずれでもよい)、mRNAを錆型としてdNTP (dATP, dGTP, dCTP又はdTTP) の存在下で、逆転写酵素を用いてmRNAに相補的な一本鎖cDNAを合成する。次のステップは、上記において遊離のオリゴdTを用いたか、ベクタープライマーに付加されたオリゴdTを用いたかにより、各々以下の如く異なる。

【0015】前者の場合、錆型としたmRNAをアルカリ処理等により分解して除去し、その後一本鎖DNAを錆型として逆転写酵素又はDNAポリメラーゼを用いて二本鎖DNAを作成する。次に得られる二本鎖DNAの両端をエキソヌクレアーゼで処理し、そのそれぞれに適当なリンカーDNA又はアニーリング可能な組合せの塩基を複数付加し、これを適当なベクターへ組込む。これは使用するベクターに応じ公知の方法、例えばヤングらの方法 [Youn g, R. A. et al., in "DNA Cloning, Vol. 1", p.49(1985)]、あるいはグブラーとホフマンの方法 [Gubler, U. and Hoffman, B. J. Gene, 25, p.263(1983)]などを使用して行われる。また、上記cDNAの合成には市販のcDNA合成キットを用いれば容易に行なうことができる。

【0016】ベクターは、特に制限はされないが、 λ gt系のファージベクターやプラスミドベクター等を宿主に応じて適当に選択し、あるいは組合せて使用できる。ここで用いられるベクターとしては λ gt10、 λ gt11等を例示でき、 λ gt10、 λ gt11をベクターとして用いる方法は前記ヤングらの方法に準じて行なうことができる。

【0017】 λ gt系のファージベクターに組込んだcDNA組換え体はインピトロパッケージング液と反応させることによりcDNA組換え体ファージとなり、 λ gt10又は λ gt11のcDNAライブラリーが構築される。上記の λ gt系ファージライブラリーの作成は市販の λ gt10又は λ gt11 cDNAクローニングキットを用いれば容易に行なうことができる。

【0018】また、後者の場合、錆型としてmRNAを残存させたまま、上記と同様のリンカーを付加した開環状プラスミドと、リンカーDNA(しばしば動物細胞で自立複製できる領域とmRNAの転写プロモーター領域を含むDNA断片が用い得る)とを、アニーリングさせて閉環状とした後、dTTP存在下で、RNaseとDNAポリメラーゼを共存させてmRNAをDNA鎖に置換し、完全なプラスミドDNAを作成できる。

【0019】上記の如くして得られるcDNA組換え体プラスミドを宿主微生物に導入し、該微生物を形質転換する。宿主微生物としては、大腸菌 (*Escherichia coli*) が代表的であるが、特にこれに限定されず、その他に枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等も使用することができる。

【0020】DNAの宿主微生物への導入及びこれによる形質転換の方法としては、一般に用いられている方法、例えば主として対数増殖期にある細胞を集め、CaCl₂処理して自然にDNAを取り込みやすい状態にして、プラスミドを取り込ませる方法等を採用できる。上記方法においては、通常知られているように形質転換の効率を一層向上させるためにMgCl₂やRbClを更に共存させることもできる。また、微生物細胞をスフェロプラスト又はプロトプラスト化してから形質転換させる方法も採用することができる。

【0021】(2) 糖タンパク質39遺伝子クローンの選択

上記により得られる形質転換株から、本発明糖タンパク質39のコアタンパク質をコードするcDNAを含有する株を選出する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。

【0022】(1) 本発明糖タンパク質39を含むレクチン結合糖タンパク質のコアタンパク質に対する抗体を用いて選出する方法

予め、cDNAを形質転換株内でタンパク質を発現し得るベクターに組込み、形質転換株内でタンパク質を产生させ、本発明糖タンパク質39を含むレクチン結合糖タンパク質のコアタンパク質に対する抗体及び該抗体に対する第2抗体を用いて、本発明糖タンパク質39を含むレクチン結合糖タンパク質のポリペプチド产生株を検出し、目的株を得る。

【0023】(2) 動物細胞で本発明糖タンパク質39のポリペプチドを产生させてスクリーニングする方法

形質転換株を培養し、遺伝子を増殖させ、その遺伝子を動物細胞にトランスフェクトし(この場合、自己複製可能でmRNA転写プロモーター領域を含むプラスミド若しくは動物細胞染色体にインテグレートするようなプラスミドのいずれでもよい)、遺伝子にコードされたタンパク質を产生させ、本発明糖タンパク質39を含むレクチン結合糖タンパク質のコアタンパク質に対する抗体を用いて本発明糖タンパク質39を含むレクチン結合糖タンパク質のポリペプチドを検出することにより、元の形質転換株より目的の本発明糖タンパク質39のポリペプチド部分をコードするcDNAを有する株を選出する。

【0024】(3) セレクティブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーションの系を用いる方法

形質転換株から得られるcDNAを、ニトロセルロースフィルター等にプロットし、本発明糖タンパク質39を含むレクチン結合糖タンパク質のポリペプチド产生細胞から

のmRNAをハイブリダイゼーションさせた後、cDNAに対応するmRNAを回収する。回収されたmRNAを蛋白翻訳系、例えばアフリカツメガエルの卵母細胞への注入や、ウサギ網状赤血球ライゼートや小麦胚芽等の無細胞系で蛋白質に翻訳させ、本発明糖タンパク質3.9を含むレクチン結合糖タンパク質のコアタンパク質に対する抗体を用いて検出して、目的の株を得る。

【0025】なお、上記方法において用いられる本発明糖タンパク質3.9を含むレクチン結合糖タンパク質のコアタンパク質に対する抗体は、公知の方法により作成することができる。

【0026】即ち、まず本発明糖タンパク質3.9を発現している組織細胞の細胞膜を界面活性剤を用いて可溶化し、これを糖タンパク質3.9が結合しうるレクチン結合アガロースカラムに吸着させて、レクチン結合糖タンパク質を調製する。

【0027】各種組織細胞の細胞膜可溶化画分分離手段としては、例えばヒト癌組織、ヒト細胞を適当な緩衝液中で破碎後、100,000×gの高速遠心分離に付し、その残渣をトリトン系界面活性剤に溶解し、これを再度100,000×gの高速遠心分離に付し、その上清を採取する方法が挙げられる。

【0028】得られた細胞膜可溶化画分より本発明糖タンパク質3.9を含むレクチン結合糖タンパク質を分離するために用いられるレクチンとしては、例えばピーナツ豆レクチン（Peanut agglutinin, PNA）が挙げられ、かかるレクチンは市販されているものを用いてもよいし、例えばピーナツ豆より自体公知の手段により抽出分離したものを用いてもよい。レクチン結合アガロースは市販されているものを用いてもよいし、通常の手段によりアガロースゲルにカップリングさせて得ることもできる。

【0029】レクチン結合糖タンパク質の溶出には、ハグテン糖、例えばラクトース溶液等が用いられる。ここで用いる溶出液の濃度は0.05～0.2Mが好ましい。

【0030】次に、本発明糖タンパク質3.9を含むレクチン結合糖タンパク質をトリフルオロメタンスルホン酸（TFS）またはフッ化水素で処理して糖鎖を除去した後、これを完全アジュバントと共にウサギ等の小動物に免疫し、さらに適当な間隔ををおいて数回不完全アジュバントと共に免疫した後抗血清を採取する。次に大腸菌を熱処理し遠心分離して得られる菌体成分と前述で得られた抗血清とを4℃にて混和した後、遠心分離すれば求められるポリクローナル抗体を得ることができる。

【0031】上記において得られた本発明遺伝子クローンは、常法に従って各種プラスミドにサブクローニングすることができる。例えばEcoRIにて切断して精製した本発明遺伝子を含むcDNA断片を、同様にEcoRIにて切断したpUC18 [Yanisch-Perron, C., et al., Gene, 83, p.103-119(1985)]などのクローニングベクターの切

断部位へ挿入すればよい。これにより所望の組換え体プラスミドを得ることができる。また得られる組換え体プラスミドの宿主への導入及びこれによる組換え体プラスミドの増幅と個別化は、一般に用いられている各種の方法、例えば主として対数増殖期にある細胞を集め、CaCl₂処理により自然にDNAを取り込みやすい状態とし、これをベクターを取り込ませる方法等により行い得る。

【0032】なお、上記において採用される各種の操作、例えば一部DNAの化学合成、DNA鎖の切断、削除、

付加ないし結合を目的とする酵素処理、DNAの単離、精製、複製、選択等はいずれも常法に従うことができる。

より具体的には、上記DNAの単離精製は、アガロースゲル電気泳動等により行うことができる。

【0033】また、上記で得られる本発明遺伝子の塩基配列の決定は、適当な制限酵素でDNAを消化した後、ジ

テオキシ法 [Sanger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 74, p.5463(1977)] やマキサム-ギルバート法

[A. M. Maxam and W. Gilbert, Methods in Enzymology, 65, p.499(1980)] 等により行い得る。更に上記塩基配列の決定は、市販のシークエンスキット等を用いることによっても容易に行い得る。

【0034】かくして得られた本発明糖タンパク質3.9

遺伝子の塩基配列の一部及び対応するアミノ酸配列を配列番号1及び配列番号2に示す。塩基の番号は5'末端

を1とし、5'末端から3'末端方向につけられている。アミノ酸残基の番号はN末端からC末端方向へつけ

られており、最初にコードされるアミノ酸を1としている。配列番号1は配列を決定できた糖タンパク質3.9遺伝子の翻訳領域のうち、最も5'末端に位置する180塩基の長さの翻訳領域で、60個のアミノ酸のタンパク質部分に相当する。この配列はPIM遺伝子と類似の60塩基(20アミノ酸残基)を1単位とするくり返し配列(tandem repeats)領域と考えられ、くり返し数には個体差があると思われる。また、配列番号2に示される糖タンパク質3.9遺伝子の翻訳領域は981塩基の長さで、327個のアミノ酸のタンパク質部分に相当する。配列番号1の配列

は塩基配列で3'側(アミノ酸配列でC末端側)にさらにくり返し配列がつながり、これに配列番号2が接続する。

【0035】得られた本発明遺伝子の利用によれば、從来公知の一般的な遺伝子組換え技術により [Science, 224, p.1431(1984); Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, p.692(1985); Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80, p.5990(1983); 特許公開第187991号公報等参照]

糖タンパク質3.9のコアタンパク質を容易に且つ大量に製造、取得することができる。また、このようにして得られる糖タンパク質3.9のコアタンパク質を用い、糖タンパク質3.9のコアタンパク質に特異的な抗体を作成することができる。抗体は通常のポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の製造法に従い製造されるが、糖タン

バク質3.9のコアタンパク質複合体に対するポリクローナル抗体からワインバーガー(Weinberger)らの方法(Science, 228, p.740-742(1985)]に従いエピトープ特異的抗体を得ることも可能である。抗体は糖タンパク質3.9及びそのコアタンパク質の精製、測定、識別等に用いられる。

【0036】また、上記の如くして得られる糖タンパク質3.9のコアタンパク質には、配列中に示すアミノ酸配列のN末端にメチオニンが結合したポリペプチド、及び上記アミノ酸配列のN末端に糖タンパク質3.9のためのシグナルペプチドの部分もしくは全部が結合、又は欠損した中間体も含まれる。かかる変異は天然に、例えば翻訳後の修飾により得られ、あるいは遺伝子工学的手法においては、天然から得た遺伝子を例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシス等の方法により改変したり、ホスファイトトリエステル法等の化学合成法により変異したDNAを合成したり、或いは両者を組合せて、遺伝子を合成できる。これらの遺伝子を利用し、これを微生物のベクターに組込み、形質転換された微生物から產生させることにより、変異を有するコンポーネントを得ることができる。又、これらのタンパク質は、その機能を保ったまま、天然或いは人口の変異により、その一部のアミノ酸の置換や配列の改変を行うことができる。従って、本発明の糖タンパク質3.9遺伝子は、上記の各種変異を有する蛋白質をコードする遺伝子も包含する。遺伝暗号の末端にはTAG、TAA等の終止コドンを付加することができる。遺伝暗号は上記配列番号1及び2に例示されたコドンに限らず、アミノ酸配列を変えることなく各アミノ酸に対し任意のコドンを選択でき、例えば遺伝子組換えに利用する宿主のコドン使用頻度等を考慮した常法に従えばよい[Nucl. Acids. Res., 9, p.43-74(1981)]。

【0037】

【発明の効果】本発明糖タンパク質3.9遺伝子を用いれば糖タンパク質3.9のコアタンパク質を容易に且つ大量に製造することができる。本発明の糖タンパク質3.9は、ヒト癌組織、特に胃癌、大腸癌、肺癌、肝癌、食道癌、肺癌などに発現が認められる一方、胃、結腸、肺など分泌性正常組織に発現していることより、腫瘍マーカー、免疫異常マーカーあるいは各種炎症性疾患マーカーとしての応用が期待される。

【0038】

【実施例】次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明する。

【0039】実施例1

本発明糖タンパク質3.9の調製：胃癌細胞KATO-III 2gを氷冷下CaCl₂およびMgCl₂添加PBS [PBS (+)] 中で細断し、これをPotter-Elvehjem型のホモジナイザーにてホモジナイズした。

【0040】この破碎液を4°Cにて1時間高速遠心(10,500×g)し、その上清を除去したペレットに2%トリトンX-100、0.15M NaCl、0.01Mトリス-HCl(pH7.6)及び50μg/mlのプロテアーゼ阻害剤であるPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオライド)(シグマ社)を含む溶液60mlを加え、さらにこれをホモジナイズしたのち4°Cにて30分放置し、細胞膜を可溶化した。これを4°Cにて1時間高速遠心(105,000×g)し、該上清を得た。

10

【0041】該上清を市販のPNA結合アガロースカラム(E.Y.ラボラトリーズ社製)に添加し、PNA結合糖タンパク質を吸着させた。

【0042】該カラムを0.1%トリトンX-100、0.15M NaCl及び0.01Mトリス-HClを含む洗浄液(pH7.6)200mlにて洗浄した。その後PNA結合糖タンパク質を0.05Mラクトース溶液50mlにて溶出させた。

【0043】溶出液中のPNA結合糖タンパク質のタンパク濃度はローリー法にて測定し、総量で3mg(タンパク含量)のPNA結合糖タンパク質を得た。

【0044】実施例2

(1) PNA結合糖タンパク質の糖鎖除去：PNA結合糖タンパク質2mgを凍結乾燥後、トリフルオロメタンスルホン酸(TMS)-アニソール(2:1)溶液1mlを加えて溶解した。反応液中に窒素ガスを通気して置換したのち25°Cで5時間攪拌し、糖鎖を分解した。反応終了後、2倍量のジエチルエーテルを加えて混和したのち、-80°Cにて1時間放置した。次に氷冷した50%ビリジン溶液を等量加えてポルテックスミキサーで攪拌し、次いでエーテル層を除去した。さらにエーテルを加えて同様にエーテル抽出を2回行ったのち、2mMビリジン-酢酸バッファー(pH5.5)4mlに對して、透析した。

【0045】(2) PNA結合糖タンパク質のコアタンパク質に対するポリクローナル抗体の作成：(1)で調製した糖鎖除去PNA結合糖タンパク質のPBS(-)溶液(タンパク質濃度800μg/ml)0.5mlとフロインドの完全アジュバント0.5mlを混和して調製した懸濁液をニュージーランドホワイト種の雄ウサギの足蹠に皮下接種した。その後2週間おきに3回、上記フロインドの不完全アジュバントとPNA結合糖タンパク質の懸濁液を足蹠又は背に皮下接種して免疫した。最終免疫後10日目にウサギの耳静脈より採血し、完全に凝血させた後4°Cで20分間高速遠心(150,000rpm)を2回くり返して上清を回収し、抗血清を得た。

【0046】(3) 抗体の吸収処理：後記実施例3(2)で示す、本発明糖タンパク質3.9のコアタンパク質をコードする組換え体ファージクローニング分離のためのスクリーニングに用いる抗体は、大腸菌菌体成分と交差反応しないことが望まれる。そこで、予めスクリーニングに用いる抗体を大腸菌(E. coli Y1090)菌体成分と反応させ、これと交差する抗体を除去した。

【0047】E. coli Y1090株をLB培地[Molecular Cloning (A Laboratory Manual); T. Maniatis, E. F. Fr

itsch, J. Sambrook; Cold Spring Harbor Laboratory (1982), p.68] 500ml 中で37°Cにて一夜培養し、5000rpm、10分間の遠心で菌体を集めた。これを20mlの蒸留水に懸濁して100°Cで5~10分間加熱処理した。更に、10,000rpmで10分間遠心したのち上清を分離した。次に、実施例2(2)で作成した抗血清をPBS(-)で50倍希釈した溶液100mlに、この上清1mlを加えて混和し、4°Cで2時間放置したのち、10,000rpmで15分間遠心し、その上清を分離して本発明糖タンパク質3-9のコアタンパク質に対する抗体を得た。

【0048】実施例3

(1) 胃癌細胞株KATO-IIIのcDNAライブラリー作成: 胃癌細胞株KATO-IIIを、RPMI-1640培地に10%の割合で牛胎仔血清を加えた培地で5%のCO₂ガス通気下37°Cにて継代培養した。得られた胃癌細胞株KATO-III 1gからアニジウムイソチオシアネート法 [Molecular Cloning (A Laboratory Manual); T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook; Cold Spring Harbor Laboratory (1982), p.196] に従って全RNA 3mgを抽出し、これをオリゴ(dt)セルロースカラム (Collaborative Research Inc., カラム容量1ml) を用いてポリ(A)⁺RNA200μgを得た。以下アマシャム社のcDNA合成システムのプロトコールに従い、2本鎖のcDNAを合成した。即ち、該当ポリ(A)⁺RNA 5μgに逆転写酵素(アマシャム社)を作用させて第一DNA鎖を合成した。次に大腸菌リポヌクレアーゼH(RNase H)及び大腸菌DNAポリメラーゼI(共にアマシャム社)を作用させ、RNAを消化しながら第一DNA鎖を鑄型として第二DNA鎖を合成し、T4DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性を利用して平滑末端を有する二本鎖cDNA(ds-cDNA)を合成した。

【0049】上記により得られたds-cDNAをさらにアマシャム社のcDNA・クローニングシステム入gt11を使って発現ベクター入gt11にクローニングした。即ちds-cDNAにEcoRIメチラーゼ(アマシャム社)を作用させ、ds-cDNAの内部にある制限酵素EcoRIの認識部位をメチル基により保護し、次にT4DNAリガーゼ(アマシャム社)により合成EcoRIリンクー(アマシャム社)を両末端に接続し、最後にこれに制限酵素EcoRI(アマシャム社)を作用させて両端を付着末端とした。

【0050】このds-cDNAと入gt11アーム(アマシャム社)をT4DNAリガーゼ(アマシャム社)により結合させ、組換えDNAを作成した。これにインヒトロパッケージング液(アマシャム社)を作用させてcDNAライブラリーを作成した。

【0051】(2) 本発明糖タンパク質3-9をコードする組換え体ファージクローニングの分離: (1)で得られた入gt11cDNAライブラリーとE. coli Y1090を37°Cにて20分間インキュベートし、組換え体ファージを宿主菌であるY1090に吸着させた後、溶解した上層軟寒天と混浴して寒天平板上にまきひろげた。上層寒天固化後寒天平板を42°C

で4~8時間培養し、ブラークを形成させた。次いで10mMイソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトシド(IPTG)で飽和させ、乾燥させたニトロセルロースフィルターを寒天平板表面に置き37°Cにて2時間インキュベートして、β-ガラクトシダーゼ融合タンパク質を発現させた。

【0052】その後これを4°Cにて1時間以上冷却した後フィルターをはがした。このフィルターを室温で1時間ブロッキング溶液(2%馬モグロビン、0.1%Tween20、PBS(-))に浸した後、該ブロッキング溶液中で実施例2(3)で吸収処理した本発明糖タンパク質3-9のコアタンパク質に対する抗体50μg/mlと反応させ、室温にて2時間インキュベートさせた。該フィルターを0.1%Tween20を含むPBS(-)で5回洗浄後、このフィルターをホースラディッシュパーオキシダーゼ(HRP)標識抗ウサギIgG抗体(Capelle社製)ブロッキング溶液(200倍希釈液)中で室温にて2時間反応させ、該反応終了後、上記の洗浄液で5回洗浄した。次いで過酸化水素含有4-クロロ-1-ナフトール溶液で発色させて本発明糖タンパク質3-9のコアタンパク質に対する融合タンパク質を発現しているクローニングを選択した。得られたクローニングの單一ブラークを分離した後、Y1090を宿主として増殖させSM緩衝液中に懸濁させて4°Cで保存した。該クローニングを入KP39と命名した。

【0053】(3) 本発明糖タンパク質3-9をコードする組換え体ファージの溶原菌作成: Huynh, T. V., Young, R. A., Davis, R. W.: DNA Colonizing Vol. 1 A Practical Approach, (ed.) Glover, D. M., IRL Press(1985) p.49-78記載の方法に従って入KP39をE. coli BNN103に溶原化させた溶原菌を作成した。

【0054】(4) 本発明糖タンパク質3-9をコードする組換え体ファージDNAの分離: (2)で得られた本発明糖タンパク質3-9をコードする組換え体ファージクローニング(入KP39)をE. coli Y1090を宿主として増殖させたのち、[Molecular Cloning (A Laboratory Manual); T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook; Cold Spring Harbor Laboratory (1982) p.371-372]記載の方法に従って、本発明組換え体ファージDNA(入KP39 DNA)を調製した。

【0055】(5) プラスミドpKP39形質転換株の作成: 入KP39 DNAを制限酵素EcoRI(日本ジーン社製)で消化し、約1900塩基対のDNA断片を得た。

【0056】一方、プラスミドベクターpBluescript II KS(ストラタージーン社製)と同じくEcoRIで消化したのち、両断片をT4DNAリガーゼ(宝酒造社製)で結合させ、本発明糖タンパク質3-9のポリペプチド鎖をコードする組換え体プラスミドpKP39を得た。

【0057】得られた組換え体プラスミドpKP39をE. coli JM83のコンビテント細胞に形質導入した。

【0058】(6) 制限酵素地図の作成: (5)で得られたpKP39を [Molecular Cloning (A Laboratory Manual);

11.

T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook; Cold Spring Harbor Laboratory (1982)p.104-106] に記載の方法に従って処理し、さら上記文献p.374-p.381の方法に従って、本発明糖タンパク質3.9をコードするpKP39 クローンの制限酵素地図を作成した(図1)。

【0059】(7) pKP39 クローンの塩基配列決定: pKP39 クローンの塩基配列の決定はサンガー (Sanger) らの方法 [Sanger F., Nicklen S. & Coulson A. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, p.5463-5467(1977)] に従って行なった。

【0060】以上の結果より得られた糖タンパク質3.9 遺伝子の配列は、翻訳領域及び3'側の非翻訳領域を含めて全体で約1900個の塩基からなる。このうち、5'末端より約600塩基は60塩基を1単位とするくり返し配列領域である。この領域を含めて翻訳領域は約1560塩基の長さで、約553個のアミノ酸のタンパク質部分をコードすることが判明した。しかし、くり返し配列領域の配列は、180塩基(60アミノ酸残基をコードし得る)を決定できた(配列番号1)が、その他のくり返し配列は未決定である。くり返し配列より下線の1320塩基の配列は決定し、配列番号2に示した。

【0061】実施例4

(1) 全RNA及びポリ(A)⁺RNAの調製

実施例3-(1)に示したグアニジウムイソチオシアネート法に従って胃癌細胞株KATO-IIIより全RNAを抽出し、また市販のオリゴ(dT)セルロースカラム(Colaborative Research Inc.)を用いてポリ(A)⁺RNAを調製した(前記Molecular Cloning p.196-198 参照)。

【0062】(2) ノーザンプロッティング

(1)で調製した全RNA20μg又はポリ(A)⁺RNA10μgを前記Molecular Cloning (p.200~201)の方法に従って、グリオキサール存在下、50°Cにて1時間加温して変性させた後、10mMリン酸ナトリウム溶液を含む1%アガロースゲルにて90Vで3~4時間電気泳動を行なった。次に分離したRNAを20×SSC中でニトロセルロースフィルター(シュライアーアンドシェル社)へ15時間かけて転写させた。RNA転写後のニトロセルロースフィルターを室温で乾燥後80°Cで2時間ペーリングして固定し、その後20mMトリス塩酸バッファー(pH 8.0)中、100°Cにて5分間加熱してグリオキサールを除去した。このフィルターを実施例3-(7)に記したプレハイブリダイゼーション溶液中で42°Cにて3時間振とうした後、 α -³²P-dCTP標識プローブを含むハイブリダイゼーション溶液(組成はプローブ以外プレハイブリダイゼーション溶液と同じ)中*

12.

*に移して42°Cにて20時間振とうした。プローブはpKP39 クローン中cDNAを制限酵素EcoRIで切断した断片をマルチプライムDNAラベリングシステム(アマシャム社)を用いて α -³²P-dCTPにて標識したものを0.5~1×10⁷cpm/mlの濃度で使用した。ハイブリダイゼーション終了後、フィルターを2×SSC-0.1%SDS溶液に移して室温で10分間ずつ3回洗浄し、更に0.1×SSC-0.1%SDS溶液中で60°Cにて30分間ずつ3回洗浄した後室温で乾燥した。フィルターをろ紙にはりつけてX線フィルムカセットに入れ、X線フィルム(コニカ社XAR-5)を重ねて-70°Cで1~3日間感光させた。

【0063】得られたノーザンプロッティングの結果を図2に示す。

【0064】なお、RNAの分子量マーカーとして28S及び18SリボソームRNAを用いた。その結果、4400塩基長及び6800塩基長の二本のmRNAが検出された。これは既知のPEM mRNAと同様にオルターナティブスプライシングにより生じたものと考えられる。

【0065】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 180

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

生物名: ホモサビエンス

細胞の種類: 胃印環細胞癌

セルライン: KATO-III

直接の起源

ライブラリーナ: λ -gt11 KATO-III cDNA library

クローン名: λ -KP39

配列の特徴

特徴を表す記号: mat peptide

存在位置: 1..180

特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: repeat region

存在位置: 1..180

特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: repeat unit

存在位置: 1..60

特徴を決定した方法: S

配列

CCC TCC ACC CCC CCC CCA GCA CAC CGT GTC ACC TCG ACC CCC CCC CGG CAG ACC ACC

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Glu Ser

1.

5

10

15

AGG CCC CCC CCC CCC ACC CGG CCC CCA CCC CAC CGT GTC ACC TCG

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Ala Ala His Gly Val Thr Ser

48

96

(8)

13

20

25

30

CCC CCG GAG AGC AGG CCG CCC TCC ACC CCG CCC CCA GCC CAC
 Ala Pro Glu Ser Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Ala Ala His

14

35

40

45

GCT GTC ACC TCG CCC CCG GAC ACC AGG CCG CCC CCC
 Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro

50

55

60

【0066】配列番号：2

* クローン名：λ KP39

配列の長さ：1320

配列の特徴

配列の型：核酸

10 特徴を表す記号：mat peptide

鎖の数：二本鎖

存在位置：1..981

トポロジー：直鎖状

特徴を決定した方法：S

配列の種類：cDNA to mRNA

特徴を表す記号：polyA signal

起源

存在位置：1267..1272

生物名：ホモサビエンス

特徴を決定した方法：S

細胞の種類：胃印環細胞癌

特徴を表す記号：polyA site

セルライン：KATO-III

存在位置：1293..1320

直接の起源

特徴を決定した方法：S

ライブラリーネーム：λ gEII. KATO-III cDNA library

*

配列

GGC TCC ACC CCC CCC CCA GCC CAC GGT GTC ACC TCG GCC CCG GAC ACC
 Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr

48

5

10

15

AGG CCC CCC TTG GGC TCC ACC GCG CCT CCA GTC CAC AAT GTC ACC TCG
 Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser

96

20

25

30

CCC TCA CCC TCT GCA TCA CCC TCA CCT TCT ACT CTG CTG CAC MC CCC
 Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu Val His Asn Gly

144

35

40

45

ACC TCT CCC ACC GGT ACC ACA ACC CCA CCC ACC AAG ACC ACT CCA TTC
 Thr Ser Ala Arg Ala Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe

192

50

55

60

TCA ATT CCC ACC CAC CAC TCT GAT ACT CCT ACC ACC CTT CCC ACC CAT
 Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His

240

65 70 75 80
 AGC ACC AAG ACT GAT CCC ACT ACC CAC CAT ACC ACC GCA CCT CCT
 Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser Thr Val Pro Pro

288

85

90

95

CTC ACC TCC TCC AAT CAC ACC ACT TCT CCC CAG TTG TCT ACT GGG GTC
 Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu Ser Thr Gly Val

336

100

105

110

TCT TTC TTG TTG CTG TCT TTT CAC ATT TCA MC GTC CAG TTT AAT TCC
 Ser Phe Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser

384

115

120

125

TCT CTG GAA GAT CCC ACC ACC GAC TAC TAC CAA GAG CTG CAG AGA GAC
 Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp

432

130

135

140

ATT TCT GAA ATG TTG CAG ATT TAT AAA CAA CCC GGT TTT CTG CCC
 Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly

480

145

150

155

160

15	CTC TCC AAT ATT AAG TTC AGG CCA GGA TCT GTG GTG GTA CAA TTG ACT	16	528
	Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr		
165		170	175
	CTG GCC TTC CGA GAA GGT ACC ATC AAT GTC CAC GAC GTG GAG ACA CAG		576
	Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln		
180		185	190
	TTC ATT CAG TAT AAA ACG GAA GCA CCC TCT CGA TAT AAC CTG ACG ATC		624
	Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile		
195		200	205
	TCA GAC GTC AGC GIG AGT GAT GTG CCA TTT CCT TCT CCC CAG TCT		672
	Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser		
210		215	220
	CGG CCT CGG GTC CCA CGC TGG CGC ATC GCG CTG CTG CTG GTC TGT		720
	Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys		
225		230	235
	GTT CTG GTT CGG CTG CCC ATT GTC TAT CTC ATT CCC TIG CCT GTC TGT		768
	Val Leu Val Ala Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys		
245		250	255
	CAG TGC CCC CGA AAG AAC TAC CGG CAG CTG GAC ATC TTT CCA CCC CGG		816
	Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg		
260		265	270
	GAT ACC TAC CAT CCT ATG AGC GAG TAC CCC ACC TAC CAC ACC CAT CGG		864
	Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr Ile Gly		
275		280	285
	CGC TAT GTG CCC CCT AGC AGT ACC GAT CGT AGC CGC TAT GAG AAG GTT		912
	Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val		
290		295	300
	TCT CGA GGT ATT CGT CGC AGC ACC CTC TCT TAC ACA AAC CCA GCA GTG		960
	Ser Ala Gly Asn Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val		
305		310	315
	CCA CGC ACT TCT CCC AAC TTG TACGGGACG TGGCCCTG AGCTGAGTC		1011
	Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu		
325		327	
	CCAGCCAGTG CCATTCACCT CCACCTCAAGT TCTTCAGGG CAGAGCCCTT CCACCCCTGTT		1071
	TGGGCTGGTG ACCTGGGAGT TCAGGTGGCC TGGTCACACC CTCCCTCAGA CGCCCCACCA		1131
	ATTTCTCGGA CACTTCAG TGTGTGGAACT CTACATGTCGG CCCCTGAGGC TCATGCCCTGG		1191
	GAAGTGTGCT GTGCGGGGCT CCCAGGGAGCA CTGGCCCTAGA GAGCCCTGAG ATACGGGGGA		1251
	TCCTGAAC TG GACTGAAAT AACGTGGCTT CCCACTGGCC CAAAAAAAA AAAAAAAA		1311
	AAAAAAA		1320

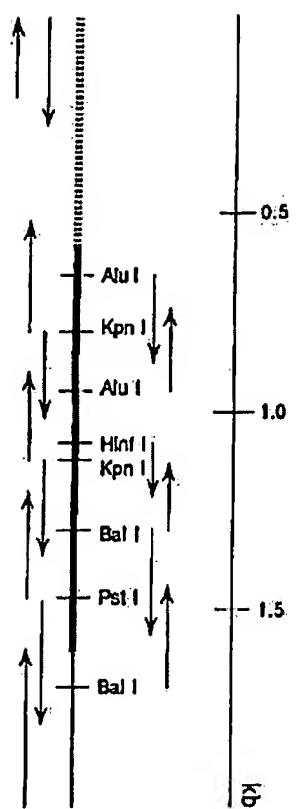
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明糖タンパク質3-9のコアタンパク質をコードするcDNAの制限酵素地図及び塩基配列決定方法を示す。図1中、最上段に示したスケールは、cDNAの1番目の塩基を基準にしたヌクレオチドの長さ（キロベース）である。その下段は本発明糖タンパク質3-9をコードするcDNAクローンpKP39を示している。該線上左側の破線

40 部分は20アミノ酸残基を1単位とするくり返し配列をコードする領域を、中央の太い黒線部分はそれにひき続くコーディング領域を示す。矢印は各DNA断片について決定した塩基配列の方向と長さを示す。

【図2】実施例4における本発明タンパク質をコードするmRNAのノーザンプロッティングを示す図面である。4400塩基長及び6300塩基長の2本のmRNAが存在する。

【図1】



【図2】

